



REG-14599702

VAUZGE

NLM -- W1 BI668 (Gen): Film S00499

US PATENT AND TRADEMARK OFFICE
SCIENTIFIC AND TECHNICAL INFO CTR
107 S. WEST STREET, PMB 803
ALEXANDRIA, VA 22314

ATTN:	SUBMITTED:	2009-01-21 16:26:16
PHONE: 571-272-2517	PRINTED:	2009-01-22 09:33:00
FAX: 571-272-0230	REQUEST NO.:	REG-14599702
E-MAIL: STIC-DOCS@uspto.gov	SENT VIA:	DOCLINE
	DOCLINE NO.:	26355831

REG	Copy	Journal
TITLE: BIOKHIMIYA (MOSCOW, RUSSIA)		
PUBLISHER/PLACE: Obedinennoe nauchno-tekhnicheskoe izd- [Moskva]		
VOLUME/ISSUE/PAGES: 1988;53(10):1667-76 1667-76		
DATE: 1988		
ISSN: 0320-9725		
OTHER NUMBERS/LETTERS: Unique ID.: 0372667		
26355831		
SOURCE: Unique Key		
MAX COST: \$4.00		
COPYRIGHT COMP.: Guidelines		
CALL NUMBER: W1 BI668 (Gen): Film S00499		
REQUESTER INFO: 676360		
DELIVERY: E-mail Post to Web: STIC-DOCS@uspto.gov		
REPLY: Mail:		

KEEP THIS RECEIPT TO RECONCILE WITH BILLING STATEMENT

For problems or questions, contact NLM at http://wwwcf.nlm.nih.gov/ill/ill_web_form.cfm or phone 301-496-5511.
Include LIBID and request number.

УДК 577.123

ИНГИБИРОВАНИЕ И ИЗМЕНЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ОКАЗАКИ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ 5-АЗАЦИТИДИНА ИЛИ S-ИЗОБУТИЛАДЕНОЗИНА

КИРНОС М. Д., АЛЕКСАНДРУШКИНА Н. Н., ДАНИУШИН Б. Ф.

РА

2. № 7. P. 1141—1148.
83. V. 10. № 1. P. 47—55.
and Agric. 1980. V. 31. № 7. P. 648—650.
43. № 3. P. 240—244.
O. V. 22. № 3. P. 263—260.
1977. V. 79. № 3. P. 544—552.
skatani H. // Arch. Biochem. and Biophys.

Биохимия. М.: Медицина, 1977. С. 65.
N. I. // Int. J. Chem. Kinet. 1985. V. 15.
1979. V. 38. P. 435—442.
на Л. К. и др. // Научные сообщения 3-го
2. С. 121.
B. E. и др. // Журн. общ. химии. 1975.

P. 193—198.
P. 47—52.
Ed. 1944. V. 16. P. 111—116.
// Photobiocchem. Photobiology. 1984. V. 7.
V. 42. № 1. P. 89—91.
P. 852—855.
S. Perkin Trans. 1987. V. 2. P. 835—839.

Поступила в редакцию
12.VIII.1987

EFFECTS OF RUTIN IN LIPID LIPIDS AND LIPOSOMES

A. V. APANASYEV I. B.
il Corporation, Moscow

) on Fe^{2+} -induced lipid peroxidation
the liposomes was studied. It was shown
and liposomes in the presence of rutin
 Fe^{2+} ions to form an inactive complex
radicals. The contribution of these mechan-
ism mixture. In bovine heart microsomes
y towards LPO. At high concentrations
M), ascorbic acid blocks LPO, whereas
a prooxidative effect. A combined use of
of toxicative effect at high Fe^{2+} concentra-
tations rutin acts as an antagonist of

Установлено, что при 3-часовом инкубировании срезаемых этилиро-
ванных проростков пшеницы возраста 72 ч с [^{14}C] оротовой кислотой в
присутствии ингибиторов метилирования ДНК 5-азацитидина (5-азаС,
100 мкг/мл) или S-изобутиладенозида (SIBA, 1,5 мМ) репликативный син-
тез меченой ядерной ДНК в клетках первого листа повышается на ~20%.
При этом относительные скорости включения в новообразованную яДНК
(по ДНК) меченых дириллиновых предшественников и формирование ли-
гированных репликативных интермедиатов (ЛРИ) заметно не изменяются.
SIBA практически полностью блокирует пострепликативное метилирова-
ние по ДНК и на ~30% ингибирует метилирование фрагментов Оказаки
(их уровень метилирования (УМ) — $100 \text{ м}^2\text{C}/(\text{C} + \text{м}^2\text{C})$ — уменьшается от
7,0—7,8 до 5,3) и ЛРИ (УМ уменьшается от 10,4 до 6,9). Под влиянием
5-азаС репликативное и пострепликативное метилирование яДНК в клет-
ках первого листа повышается очень резко: УМ синтезируемых при
этом фрагментов Оказаки и ЛРИ составляет всего лишь 1,0±0,2. SIBA
не влияет на специфичность метилирования (распределение $\text{м}^2\text{C}$ по дирилли-
новым изолатам в по ДНК), а в присутствии 5-азаС в по ДНК возрастает
относительное содержание $\text{м}^2\text{C}$ в чередующихся Рн-Рн последо-
вательностях во фрагментах Оказаки и в лигированных репликативных ин-
термедиатах. Таким образом, в проростках пшеницы под влиянием SIBA
или 5-азаС существенно ингибируется метилирование яДНК, в новообра-
зованных дуплексах яДНК возникают многочисленные дополнительные
недометилированные участки и изменяется специфическая организация
метилированных сайтов в реплицирующемся ядерном геноме.

Установлено, что у растений [1—6] и у животных [1, 7—11] суще-
ствуют дискретные этапы метилирования цитозиновых остатков в ядерной
ДНК (яДНК) — репликативное и пострепликативное метилирование.
В свою очередь этап репликативного метилирования ДНК у растений и
животных протекает по крайней мере в две стадии: сначала метилиру-
ются фрагменты Оказаки, а затем продукты их лигирования [1—3, 7, 8].
Эти две стадии репликативного метилирования ДНК по-разному чувст-
вительны к ингибиторам и фиторегуляторам: в L-клетках вторая стадия
блокируется S-изобутиладенозином (SIBA), а в суспензионной культуре
клеток табака — ауксином (2,4-Д), в то время как первая стадия ре-
пликативного метилирования ДНК к этим веществам соответственно
оказалась нечувствительной [2, 8]. Мы предположили, что эти стадии
репликативного метилирования ДНК в культурах клеток могут обус-
лавливаться разными по свойствам, чувствительности к ингибиторам и спе-
цифичности действия ДНК-метилазами [1, 7, 8].

В культурах растительных (суспензионная культура клеток табака
[2]) и животных клеток (L-клетки мыши [7, 8]) фрагменты Оказаки
метилированы в 1,5—2 раза меньше, чем суммарная новообразованная
ДНК. О метилировании фрагментов Оказаки в клетках целого растения
до недавнего времени ничего не было известно. Разумно, неизвестно,
могут ли влиять на этот процесс в целом растения такие ингибиторы ме-
тилирования ДНК, как SIBA и 5-азацитидин (5-азаС). SIBA — синтети-

Принятые сокращения: 5-азаС — 5-азацитидин, SIBA — S-изобутиладено-
зил, яДНК — ядерная ДНК, по ДНК — новообразованная ДНК, ЛРИ — лигированные
репликативные интермедиаты, УМ — уровень метилирования ДНК ($100 \text{ м}^2\text{C}/(\text{C} + \text{м}^2\text{C})$).

ческий аналог S-аденозилметионина (SAM); подобно S-аденозилгомоцистеину (SAH) SIBA является конкурентным ингибитором многих реакций метилирования в клетке, в том числе и катализируемых ДНК-метилазами. В отличие от очень широкого действия SIBA на реакции метилирования в клетке 5-азидцитидин намного более избирателен в отношении ингибирования метилирования именно ДНК; он преимущественно подавляет метилирование в результате аклоения в нодНК-5-азидцитозинсодержащие ДНК прочно связывают ДНК-метилазы и «выводят их из игры» [12-18].

Нам удалось разработать систему методов, позволяющую выделить и очистить фрагменты Оказки из синхронно делящихся клеток первого формирующегося листа этилированных проростков пшеницы [3, 6]. Оказалось, что и в целом растении фрагменты Оказки метилированы, однако в проростках пшеницы уровень метилирования ($UM=7.0-7.5$) фрагментов Оказки в 3-4 раза меньше, чем зрелой или сузмарной яДНК [3, 6, 19, 20]. Как и в культуре клеток, репликативное метилирование ДНК в проростках пшеницы протекает в две стадии (метилирование фрагментов Оказки и затем — продуктов их лингирования). Однако в отличие от культуры клеток в целом растении эти две стадии репликативного метилирования по UM почти не различаются [3]. В результате нодНК в проростках пшеницы резко недометилированы, на цепи (дуэлексе) метилированы асимметрично [3, 19]. Эта асимметрия постепенно уменьшается к концу клеточного цикла в результате пострепликативного метилирования [4, 5, 19]. Мы предположили, что такое характерное изменение уровня и асимметрии цепей ДНК в клеточном цикле может служить эффективным механизмом регуляции как транскрипции, так и репликации [5, 19]. В частности, скоординированные репликативное и пострепликативное метилирование ДНК могут определять очередность и точность репликации тех или иных компартиментов генома. На наш взгляд, то или иное воздействие (в том числе и ингибиторами) на соответствующие этапы метилирования яДНК может изменить временную организацию репликации генов и их экспрессию. Детальное изучение метилирования ДНК, в том числе и на ранних этапах репликации (фрагменты Оказки), важно для расшифровки роли этой энзиматической модификации генома в процессах клеточной дифференцировки и морфогенеза растений.

В настоящей работе продолжено исследование репликации и репликативного метилирования яДНК: изучено влияние ингибиторов метилирования SIBA и 5-азидС на скорость репликации, уровень и специфичность метилирования фрагментов Оказки в S-фазе клеточного цикла синхронно и многократно делящихся клеток первого формирующегося листа этилированных проростков пшеницы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Прорастившие семена пшеницы Мироновская 898, синхронизацию роста проростков и выделение меченых [2- ^{14}C]оротовой кислоты и L-гистидина меченным фрагментом Оказки из синхронно проходящих раннюю S-фазу клеточного цикла клеток первого листа, а также анализ уровня и специфичности их метилирования проводили, как описано ранее [3, 6, 20, 21]. Этилированные проростки (200—500 шт.) срезают (в начале S-фазы в клетках первого листа, 71—74 ч развития) и инкубировали в течение 30 мин в растворе SIBA (1.5 мМ) фирмы «Calbiochem» (CSHA) или 5-азидС (100 мкг/мл) фирмы «Serva» (FPT) в присутствии 100 мкг/мл EtBr, а затем еще 3 ч в таких же растворах в присутствии [2- ^{14}C]оротовой кислоты (200—500 мкг/мл «Изохот» (СССР), удельная радиоактивность, $UP=13.4$ мкг/моль) или L-гистидина («Изохот» (СССР), удельная радиоактивность, $UP=21.8$ мкг/моль). Меченые проростки делятся при температуре жидкого азота, либрируют в смеси со сбалансированной 0.1 М при-НСН-буфер, 0.1 М Na $_2$ EDTA, 1% D6-Na, pH 7.5—8.0, и выделены высокомолекулярную яДНК фракционированием азата путем центрифугирования в градиенте и плотности CsCl [6, 21].

Меченые репликативные фрагменты «мозаобразной» яДНК (ноДНК) выделяли в стандартном градиенте концентраций (5—20%) сахарозы, как уже было описано [3, 6]. Уровень метилирования ($UM=100$ $m\%/(C+m\%C)$) меченных [2- ^{14}C]оротовой кислот репликативных фрагментов определяли после их гидролиза до оснований, разделяя их сепарацией дуперной ТСХ на целозиле и измерения радиоактивности в С и

$m\%C$ [20]. Для определения соотношения ДНК гидролизуют до нуклеотидов Петерсена [22], которые разделяют ДЭАЭ-метилом [20]. ССМ специфически выделяет Рн- $m\%C$ и $m\%C$ ССМ в метилах [2- ^{14}C]оротовой кислоты и полиаденилированных Аденосинот в остатках $m\%C$. Расчет «моза» фрагментов проводили по формуле, не гидролизуют приращенные «моза» фрагменты, проб итерации в «моза» фрагментах считали Mark-111, точность счета составляла 85—90%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее мы разработали систему методов, позволяющую выделить и очистить фрагменты Оказки из синхронно делящихся клеток первого формирующегося листа этилированных проростков пшеницы [3, 6]. Оказалось, что и в целом растении фрагменты Оказки метилированы, однако в проростках пшеницы уровень метилирования ($UM=7.0-7.5$) фрагментов Оказки в 3-4 раза меньше, чем зрелой или сузмарной яДНК [3, 6, 19, 20]. Как и в культуре клеток, репликативное метилирование ДНК в проростках пшеницы протекает в две стадии (метилирование фрагментов Оказки и затем — продуктов их лингирования). Однако в отличие от культуры клеток в целом растении эти две стадии репликативного метилирования по UM почти не различаются [3]. В результате нодНК в проростках пшеницы резко недометилированы, на цепи (дуэлексе) метилированы асимметрично [3, 19]. Эта асимметрия постепенно уменьшается к концу клеточного цикла в результате пострепликативного метилирования [4, 5, 19]. Мы предположили, что такое характерное изменение уровня и асимметрии цепей ДНК в клеточном цикле может служить эффективным механизмом регуляции как транскрипции, так и репликации [5, 19]. В частности, скоординированные репликативное и пострепликативное метилирование ДНК могут определять очередность и точность репликации тех или иных компартиментов генома. На наш взгляд, то или иное воздействие (в том числе и ингибиторами) на соответствующие этапы метилирования яДНК может изменить временную организацию репликации генов и их экспрессию. Детальное изучение метилирования ДНК, в том числе и на ранних этапах репликации (фрагменты Оказки), важно для расшифровки роли этой энзиматической модификации генома в процессах клеточной дифференцировки и морфогенеза растений.

Мы изучили влияние SIBA на репликативное метилирование яДНК проростков пшеницы. Предварительные эксперименты показали, что высокие концентрации SIBA (100 мкг/мл) ингибируют рост проростков в течение 3 ч инкубации. В контрольных проростках метилирование яДНК почти не изменяется. В проростках, инкубированных в течение 3 ч инкубации, метилирование яДНК почти полностью ингибируется. При более длительных инкубациях метилирование проростков (рис. 1). Вероятно, ингибирование проростков.

Мы изучили влияние SIBA на репликативное метилирование яДНК проростков пшеницы. Предварительные эксперименты показали, что высокие концентрации SIBA (100 мкг/мл) ингибируют рост проростков в течение 3 ч инкубации. В контрольных проростках метилирование яДНК почти не изменяется. В проростках, инкубированных в течение 3 ч инкубации, метилирование яДНК почти полностью ингибируется. При более длительных инкубациях метилирование проростков (рис. 1). Вероятно, ингибирование проростков.

Уровень (UM) и сайтовая специфичность метилирования

Размер репликативного фрагмента ДНК, нуклеотидов	Условия инкубации проростков
15	Контроль
15	SIBA
15	1.7 мкг/мл 5-азидС
15	100 мкг/мл 5-азидС

* Увеличение инкубации проростков в течение 3 ч инкубации, в течение 3 ч инкубации.

(SAM); подобно S-аденозилгомо-
нуклеинитам лигатором многих
их числе и катализируемых ДНК-
рокового действия SIBA на реакцию
а именно ДНК; он преимущественно
результате включения в нодНК
о связывают ДНК-метилазы и «вы-

у методов, позволяющую выделить
пиронно действующих клеток первого
ных проростков пшеницы [3, 6].
фрагменты Оказали метилирова-
ень метилирования (УМ=7,0-7,5)
ыше, чем зрелой или суммарной
е клеток, репликативное метилиро-
протекает в две стадии (метилиро-
продуктов их лигирования). Одна-
целом растения эти две стадии ре-
а почти не различаются [3]. В ре-
ицы резко недометилированы, их
иметрично [3, 19]. Эта асимметрия
источного цикла в результате пост-,
19]. Мы предположили, что также
иметрии пелей ДНК в клеточном
механизмом регуляции как тран-
3 частности, скоординированные ре-
етилирование ДНК могут опреде-
ления тех или иных компартов
е воздействие (в том числе и пив-
ны метилирования яДНК может
пликация генов и их экспрессию. Де-
НК, в том числе и на ранних этапах
важно для расширения роли этой
а в процессах клеточной дифферен-

исследование репликации и репли-
учено влияние ингибиторов метили-
репликации, уровень и специфич-
оказали в S-фазе клеточного цикла
а клеток первого формирующегося
шеницы.

СЛЕДОВАНИЯ

вская 808, синхронизацию роста проростков
лотой и L-[метил-¹⁴C]метионинном фрагмен-
ию S-фазу клеточного цикла клеток ли-
фичности их метилирования проводили, ка-
ные проростки (200-500 шт.) срезади (в
1-74 ч развития) и инкубировали в те-
иры «Salbichost» (США) или 5-азад-
существо 100 мкг/мл ЕйВ, а затем еще 3 ч
С)оротовой кислоты (200-500 мКи/мл-
ость, УР=43,4 мКи/ммоль) или L-[метил-
изотопов (Венгрия), УР=21,3 мКи/ммоль).
пературе жидкого азота, лигировали в сме-
L Na₂SO₄, 1% DS-Na, pH 7,5-8,0, и вы-
ишрошамеи лигата путем дефитрирова-
свообразованной яДНК (ноДНК) выделяли
20%) сахарозы, как уже было описано [2,
2/(C-m¹⁴C)] меченных [2-¹⁴C]оротовой кле-
или после их гидролиза до оснований, раз-
цисолое и измерили радиоактивности в С

м¹⁴C [20]. Для определения сайтовой специфичности метилирования (ССМ) фрагмен-
ты ДНК гидролизали до пиримидиновых последовательностей по методу Ватсона и
Петерсена [22], которые разделяли по длине и составу путем длюметрической ССМ на
ДН-А-аденин-гуанин [20]. ССМ оценивали по количеству меченых остатков м¹⁴C в после-
довательности Рн-м¹⁴C-Рн, а % от всего меченого м¹⁴C в нодНК. Для определения
ССМ в меченых [2-¹⁴C]оротовой кислотой фрагментах репликации выделенные из них
моно- и полипиримидиновые блоки гидролизали до оснований и измеряли радиоак-
тивности в остатках м¹⁴C. Расчет ССМ меченых L-[метил-¹⁴C]метионинном репликаци-
ных фрагментов проводили по формуле (2) (см. раздел «Результаты и их обсужде-
ние»), не гидролизую пиримидиновые дезоксирибонуклеотиды до оснований. Ра-
диоактивности проб измеряли в люксасоме синхронизаторе с помощью жидкостно-
считывающего счетчика Mark III фирмы «Траско Лабс» (Голландия). Эффек-
тивность счета составляла 85-90%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы разработали систему методов, позволяющую выделить сво-
бодную от примесей фракцию фрагментов Оказки из синхронно дей-
ствующих клеток первого листа проростков пшеницы [3, 6]. Уровень и спе-
цифичность метилирования этих фрагментов репликации являются
вполне надежными критериями дискретности этапа репликативного ме-
тилирования ДНК в клетках зрелой [3, 6]. Репликативное метилиро-
вание яДНК скоординировано с ее репликативным синтезом (ДНК-ме-
тилаза - компонент репликативного комплекса). Репликативный ком-
плекс, скорее всего, является компонентом ядерного матрикса и занима-
ет в нем относительно фиксированное положение [23, 24]. Мы пред-
положили, что «репликативная» ДНК-метилаза в отличие от «постре-
пликативной» ДНК-метилазы «приспособлена» функционировать на
фоне повышенных концентраций SAM и должна более четко различать
SAM и его аналоги [5].

Мы изучили влияние SIBA на синтез и отдельные стадии реплика-
тивного метилирования яДНК в первом листе этилированных пророст-
ков пшеницы. Предварительно мы убедились в том, что в присутствии
высоких концентраций SIBA (1,5 мМ) в среде инкубации УМ новообра-
зованной в течение 3 ч инкубации с меткой [2-¹⁴C]оротовой кислоты
яДНК почти не изменяется в отличие от равномерно возрастающего
УМ яДНК в контрольных проростках (рис. 1). Это означает, что SIBA
почти полностью ингибирует пострепликативное метилирование нодНК.
При более длительных инкубациях (5-6 ч) эта нодНК все же домети-
лируется (рис. 1). Вероятно, это связано с разрушением SIBA в клетках
первого листа.

Мы изучили влияние SIBA на метилирование собственно фрагментов
Оказки (табл. 1). Для этого мы выделяли фрагменты Оказки из
яДНК проростков, инкубированных с [2-¹⁴C]оротовой кислотой в те-
чение 3 ч. Около 95-98% нодНК представлено ЛРП ($\geq 15S$, рис. 2), ко-
торые уже дополнительно метилированы в результате постреплика-
тивного метилирования. На это указывает их более высокий УМ по сравне-

Таблица 1

Уровень (УМ) и сайтовая специфичность метилирования (ССМ) нодНК
в первом листе проростков пшеницы

Размер репликационного фрагмента ДНК, различия S	Условия инкубирования проростков *	УМ	ССМ
		100m ¹⁴ C/(C-m ¹⁴ C)	Соотношение м ¹⁴ C в Рн-m ¹⁴ C-Рн, % от всего м ¹⁴ C в нодНК
$\begin{matrix} \searrow 15 \\ \searrow 15 \\ \searrow 15 \\ \searrow 15 \\ \searrow 15 \\ \searrow 15 \end{matrix}$	Контроль	7,8±0,4	13,5±1,5
		10,4±0,2	46,0±2,0
	SIBA	5,3±0,5	21,7±2,0
		6,8±0,4	45,0±2,0
	5-аздС	1,0±0,2	31,1±1,4
	100 мкг/мл	1,0±0,2	52,0±3,0

* Условия инкубирования проростков: срезаемые проростки возраста 72 ч инкубировали 30 мин в ресто-
вочной SIBA или 5-аздС, а затем еще 3 ч в присутствии ингибиторов и [2-¹⁴C]оротовой кислоты или L-[метил-¹⁴C]метионина.

Условия инкубирования проростков *	Выделено ДНК, мг		Удельная радиоактивность (УР) нДНК; расп. в мин на 1 мкг ДНК				Состав нДНК 100(mgC+Cs) /(m ² C+C+T)
	метка: [2- ¹⁴ C]оротовая кислота	метка: L-[метил- ¹⁴ C] метионин	[2- ¹⁴ C]оротовая кислота		L-[метил- ¹⁴ C]метионин		
			УР	% от к	УР	% от к	
Контроль (к)	1,5	1,8	870	100	358	100	39,5±0,5
SIBA, 1,7 мг/ мл	1,0	1,0	870	77	214	80	40,8±1,0
5-азаС 100 мкг/мл	1,3	1,2	700	80	292	83	39,5±0,6

* Условия инкубирования проростков см. в табл. 1.

использовать в качестве инструмента, дискриминирующего эти два этапа метилирования ДНК и, по-видимому, «репликативную» и «пострепликативную» ДНК-метилазные активности в растительной клетке. Не исключено, что эти ДНК-метилазы обладают разным средством к SIBA. Любопытно отметить, что наряду с ингибированием метилирования ДНК SIBA заметно (на 23%) ингибирует и репликативный синтез яДНК (см. табл. 2) [25]. При этом соотношение скоростей синтеза и ингибирования фрагментов Оказки не изменяется: распределение мочевины в присутствии SIBA по длине в щелочном градиенте сахарозы практически не отличается от нДНК контрольных проростков (рис. 2). К сожалению, механизм влияния SIBA на синтез ДНК в проростках пшеницы пока не известен. Возможно, что подавление синтеза с помощью SIBA реализуется на уровне фибров предшественников синтеза ДНК. В то же время в присутствии SIBA относительные скорости включения в ДНК новообразованных из [2-¹⁴C]оротовой кислоты пиримидиновых предшественников синтеза (величина $100 (C+m^2C)/(m^2C+C+T)$) по сравнению с контролем не изменяются (табл. 2). Не исключено, что ингибирование синтеза ДНК SIBA связано и с подавлением пострепликативного метилирования яДНК в клеточном цикле: в присутствии SIBA асимметрично метилированные дуплеты яДНК, возникшие в предыдущей S-фазе, не метилируются и, следовательно, не приобретают компетентность к новому циклу репликации [5, 19]. Тем самым влияние этого ингибитора метилирования яДНК на репликацию в делящихся клетках растений может заключаться в нарушении ее динамики: задержке вступления в репликацию отдельных компарментов генома в клеточном цикле. Наконец, не исключено, что SIBA может снижать собственно скорость репликативного синтеза яДНК путем ингибирования активности «репликативной» ДНК-метилазы как компонента репликативного комплекса.

На наш взгляд, для установления зависимости скорости репликации от репликативного метилирования более адекватно может послужить такой ингибитор метилирования ДНК, как 5-азаС.

В клетке он фосфорилируется и включается в ДНК по матричному механизму вместо dCMP [26, 27]. ДНК-метилаза прочно связывается с 5-азаС-содержащей ДНК и «выходит из игры» [27]. О влиянии 5-азаС на метилирование ДНК у высших растений практически ничего не известно. Ранее мы установили, что 5-азаС в свободном виде не влияет на пострепликативное метилирование яДНК в проростках пшеницы [5]. Следовательно, он не должен оказывать влияния на определяемое асимметрией цепей по содержанию ¹⁴C вступление ДНК в репликацию, но мог бы повлиять на скорость репликативного синтеза. Действительно, как мы установили здесь (табл. 2) и ранее [25], этот ингибитор метилирования ДНК в проростках пшеницы ингибирует включение в нее меченых предшественников синтеза: [2-¹⁴C]оротовой кислоты (табл. 2) или ³H-тимидина [25]. При этом, как и в случае SIBA, в присутствии

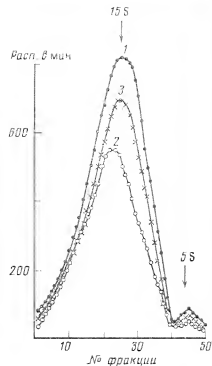


Рис. 2

ирования (УМ= $100m^2C/(C+m^2C)$) яДНК. Меткам первого листа этиолированных проростков, инкубированных в течение 30 мин в течение 0,5, 3 и 6 ч в таком же растворе, первого листа выделяли ДНК и определяли — контроль, 2 — SIBA

известности меченной [2-¹⁴C]оротовой кислотой «из-за» яДНК в клетках первого листа этиолированных проростков. 72-часовые проростки [2-¹⁴C]оротовой кислоты и одного из) в течение 3 ч, а затем выселяли яДНК ток в градиенте CsCl [6]. нДНК фракционировали сахарозы (5—20%) в роторе SW-28 патл (США) при 20°, 20 000 об/мин, в те и ко для для проростков. В аликохтах (5—10%) со. 1 — контроль, 2 — SIBA, 3 — 5-азаС

1, рис. 1). Остальные 2—5% радио-собственно фрагментам Оказки. ни оценить влияние ингибиторов не-ликативного метилирования ДНК —, а также и в определенной мере на новообразованной в их присутствии ибруст первую стадию репликатив-фрагментов Оказки в присутствии это-же контроля (табл. 1). Кроме инги-гентов Оказки, SIBA, по-видимому, ативного метилирования ДНК — мет-ов: на это указывает то, что инги-рсутствии SIBA метилированы в $\geq 15S$ и фрагменты Оказки в ком-ким образом, SIBA ингибирует как-вное метилирование яДНК. Однако-тодавляется SIBA гораздо сильнее. ДНК. Следовательно, SIBA можно

5-azaC соотношение скоростей синтеза и лигирования фрагментов репликации не изменяется (рис. 2).

Мы установили, что при нуклеировании простокост с 5-azaC этот нуклеотид резко и почти полностью (на 80–90%) подавляет метилирование фрагментов Оказки в первом листе (табл. 1). Новобразования, в присутствии 5-azaC дННК тек и остается почти совсем неметилированными: УМ фрагментов Оказки ($UM_{1.0 \pm 0.2}$) и лигнированного ДНК ($U_{185}UM_{1.0 \pm 0.2}$) практически одинаковы (табл. 1). Следовательно, и в растительных клетках, как и в клетках животных [27] 5-azaC блокирует метилирование, только включившись в ДНК.

Анализ действия SIBA и 5-azaC на синтез и репликативное метилирование ДНК в клетках высшего растения (пшеница) приводит к заключению, что репликативное метилирование ДНК непосредственно не влияет на скорость репликации генома в этом же клеточном цикле. Так, одно и то же уменьшение скорости репликации (на ~20%) наблюдается как при ингибировании репликативного метилирования на 30-40% SIBA, так и на фоне почти полного его подавления 5-azaC (табл. 1, 2).

Следует подчеркнуть, что почти полное блокирование метилирования синтезируемых в присутствии 5-азаС фрагментов Оказки заметно не сказывается на их последующем лигировании. Иными словами, второй этап репликативного синтеза ДНК — лигирование фрагментов Оказки — относительно независим от метилирования. К сожалению, механизмы резкого подавления метилирования нОДНК 5-азацитидином все еще не ясны. Можно думать, что вновь синтезированная 5-азаС-содержащая ДНК прочно связывает ДНК-метилазу и инактивирует ее [13—15, 17, 18]. Это может означать, во-первых, что содержащие 5-азаС зоны формирующегося хроматина должны быть значительно обогащены связанной ДНК-метилазой и, во-вторых, «прочное» связывание фермента с синтезированными фрагментами, по-видимому, почему-то не мешает их лигированию.

К настоящему времени уже имеются отдельные указания на то, что метилирование ДНК может рассматриваться как возможный механизм контроля за репликацией. Так, например, у *dam*-мутантов *E. coli* репликация плазмидной ДНК не происходит, она разрешается в этих клетках только метилированным этой метилазой *in vitro* плазмидам [28, 29]. По нашим предварительным данным, после инкубации целых проростков пшеницы в присутствии 5-azaC синхронная репликация ДНК в последующих клеточных циклах в клетках первого листа резко подавлена. Существует представление о том, что в репликацию могут вступать лишь симметрично прометилированные дуплексы ДНК [5, 19, 30]. Значит, начавшаяся в присутствии 5-azaC репликация исходной ДНК, по-видимому, может завершиться, а у сформированных дочерних молекул ДНК с полуметилированными участками она уже заметно искажена и затруднена.

Зависимость скорости репликации генома от его метилирования у растений, по-видимому, определяется компетентностью тех или иных кластеров репликонов к репликации, что, вероятно, зависит от того, насколько быстро в клетке уменьшается степень асимметрии комплекментарных цепей ДНК по содержанию остатков mC [5, 19]. Следовательно, временная организация репликации тех или иных компартов генома будет зависеть от степени зрелости степени метилирования цепей ДНК, новообразованных в предыдущем цикле ее репликации. Таким образом, репликация ядерного генома — последовательность (очередность) репликации отдельных его участков — должна зависеть от скоординированности процессов репликативной и пострепликативной метилирования ДНК. Поскольку два этапа энзиматической модификации ДНК могут избирательно регулироваться ингибиторами метилирования и фитогормонами [2, 3, 31], это дает принципиальную возможность более-менее направленного влияния на ключевую дифференцировку и рост растений посредством модуляции метилирования ядерного генома в мере

стематических зонах вы-
ток ингибирование 3-азид-
точного цикла индуцирует
ием 3-азидС на метилпро-
организации репликаций. Э-
Мы установили, что под в-
ной дифференцировки и ре-
букруется репликационный С
[2, 31, 36]. По-видимому, к-
тений: индукция клеточной
этапа включает формирова-
ниющих под действием т-
ятерный геном.

В качестве показателя (ССМ) ДНК удобно использовать $m^{\circ}C$ в чередующейся юпиримидиновых последовательностях. В результате кислотного гидролиза, что в ДНК животных использована именно в этой позиции всего лишь 20% всех цит

ССМ яДНК на двух ста-
на; фрагменты Оказани (па-
в клетках животных мети-
новых блоках (ССМ-20), а
моиопризмидиновой фрак-
ция в ССМ на двух стади-
чередующийся дискретный
ностью метилированных по-
выших растений небезраз-
определенную роль при фо-
низации. Поэтому было ин-
нем модулироваться также
репликации. Мы исследова-
ных репликативных интер-
присутствии SIBA и 5-aza-
предшественника — L-мети-

«Короткоживущие» в к. подтверждены построением в описанных условиях выходовной от мТДНК и продуктивности метилирования из L-[метил-¹⁴C]истеонина, низки в остатках мТС, содержащейся в юДНК из L-метилжелезы в пуриновых основаниях, сравнительно количество (мол.%) этого [20]. Так как в цитозиновую включается менее 3–5% метка во фракции рСР, остатков мТС во фракции составят величину

а относительная доля m^5C гетероциклов от всего m^5C фракции

100pCp/(p

где $R_{\text{упр}}_{n+1, n \geq 2}$ — радиоактивна в полипиримидиновые

а и лигирования фрагментов ре-
анна проростков с 5-азаС этот ти-
80–90%) подавляет метилирова-
е (табл. 1). Новообразованная
ается почти совсем неметилиро-
 1.0 ± 0.2) и актированной ДНК
иаксов (табл. 1). Следовательно,
отках животных [27] 5-азаС близ-
ишь в ДНК.

а синтез и репликативное метили-
ения (пшеница) приводит к за-
рование яДНК непосредственно
юма в этом же клеточном цикле,
и репликации (на ~20%) набо-
кативного метилирования на 30-
поного его подавления 5-азаС

тное блокирование метилирования
С фрагментов Оказки заметно не-
равен. Иными словами, второй
лигирование фрагментов Оказа-
лирования. К сожалению, меха-
анизма ноДНК 5-азацитидином все-
е синтезированной 5-азаС-содер-
метиلاзу и инактивирует ее [13-
первых, что содержащие 5-азаС
жны быть значительно обогащены
х, «прочное» связывание фермен-
по-видимому, почему-то не меша-

ся отдельные указания на то, что
иваться как возможный механизм
мер, у Δ mut- мутантов *E. coli* ре-
еходит, она разрешается в этих
и метилазой *in vitro* плазмидам
и данным, после инкубации целых
5-азаС синхронная репликация
тах в клетках первого листа резко
е о том, что в репликацию могут
ированные дуплексы ДНК [5, 19,
и 5-азаС репликация исходной
ся, а у сформированных дочерних
и участками она уже заметно ис-

и генома от его метилирования у
комплетионности тех или иных
что, вероятно, зависит от того, на-
я степень асимметрии комплемен-
статков m^5C [5, 19]. Следовательно
тех или иных компартиментов
зршенности метилирования целой
м цикле ее репликации. Таким об-
-последовательность (очередность)
должна зависеть от скоординиро-
пострепликативного метилирова-
агической модификации ДНК мо-
обиторами метилирования и фито-
липальную возможность более-ме-
ную дифференцировку и рост рас-
ирования ядерного генома в мери-

стематических зонах высших растений. Так, в культуре животных клет-
ок ингибирование 5-азаС метилирования яДНК на ранней S-фазе кле-
очного цикла индуцирует клеточную дифференцировку [27]. Под влия-
нием 5-азаС на метилирование ДНК отмечено изменение временной
организации репликации отдельных локусов X-хромосомы [27, 32–35].
Мы установили, что под влиянием фитогормонов — индукторов клеточ-
ной дифференцировки и регуляторов роста и развития растений — инги-
бируются репликативный синтез и репликативное метилирование яДНК
[2, 31, 36]. По-видимому, как в клетках животных, так и у высших рас-
ений индукция клеточной дифференцировки в качестве необходимого
этапа включает формирование неометилированных участков ДНК, воз-
никающих под действием тех или иных агентов на реплицирующийся
ядерный геном.

В качестве показателя сайтовой специфичности метилирования
(ССМ) ДНК удобно использовать данные по относительному содержа-
нию m^5C в чередующейся Р-и-Р-и последовательности (фракции моно-
пириимидиновых последовательностей, выщепляемых из ДНК в ре-
зультате кислотного гидролиза с дифениламином [22]) [3]. Характе-
рно, что в ДНК животных и растений почти половина всего m^5C локали-
зована именно в этой последовательности [20], хотя в ней содержится
всего лишь 20% всех цитозиновых остатков яДНК [20].

ССМ яДНК на двух стадиях репликативного метилирования различ-
на: фрагменты Оказки (первая стадия) как у высших растений, так и
в клетках животных метилированы преимущественно в полипириимиди-
новых блоках (ССМ=20), а участки лигирования (вторая стадия) — в
монопириимидиновой фракции (ССМ \geq 80) [3, 6]. Четкие и резкие разли-
чия в ССМ на двух стадиях репликации яДНК позволяют думать, что
чередующийся дискретный характер организации с разной специфич-
ностью метилированных последовательностей в реплицирующейся ДНК
высших растений небезразличен для ДНК-белкового узнавания и играет
определенную роль при формировании хроматина разных уровней орга-
низации. Поэтому было интересно выяснить, может ли наряду с уров-
нем модулироваться также и специфичность метилирования яДНК при
репликации. Мы исследовали ССМ фрагментов Оказки и лигирован-
ных репликативных интермедиатов, сформированных как без, так и в
присутствии SIBA и 5-азаС. При этом мы использовали два меченых
предшественника — L-[метил- ^{14}C]мететинон и [2- ^{14}C]оротовую кислоту.

«Короткоживущие» в клетке фрагменты Оказки практически не
подвержены пострепликативному метилированию [6]. Кроме того,
в описанных условиях выделения [6] эту фракцию можно получить сво-
бодной от мтДНК и продуктов деградации яДНК. Мы исследовали спе-
цифичность метилирования фрагментов Оказки по включению метки
из L-[метил- ^{14}C]мететинона. Как установлено ранее, в проростках пше-
ницы в остатках m^5C содержится не более 50% радиоактивности, вклю-
ченной в ноДНК из L-[метил- ^{14}C]мететинона; остальная метка обнару-
живается в пуриновых основаниях и тимине ДНК [3, 36]. Эту радио-
активность сравнительно просто учесть, измерив метку в рТр и
количество (мол.%) этого нуклеотида в ДНК (величина 6,65 мол.%)
[20]. Так как в цитозиновые остатки ноДНК из L-[метил- ^{14}C]мететини-
на включается менее 3–5% от радиоактивности всех оснований, почти
вся метка во фракции рСр принадлежит р m^5C р. Значит, радиоактив-
ность остатков m^5C во фракции полипириимидиновых последовательно-
стей составит величину

$$P_{y-p} = P_{n+1, n+2} - 3,18pTr, \quad (1)$$

а относительная доля m^5C во фракции монопириимидиновых последова-
тельности от всего m^5C фрагментов Оказки равна

$$100pCr / (pCr + P_{y-p} = P_{n+1, n+2} - 3,18pTr), \quad (2)$$

где $P_{y-p} = P_{n+1, n+2}$ — радиоактивность, включенная из L-[метил- ^{14}C]мететини-
на в полипириимидиновые блоки; рТр и рСр — радиоактивность в мо-

полипиримидиновой фракции дезокситимидиновой и дезоксигуанидиновой кислот соответственно. Следовательно, для определения ССМ фрагментов Оказки, меченных L-[метил- ^{14}C]метионином, нужно разделить по составу и выделить из ДНК монопиримидиновые нуклеотиды рСР. рТР, а также получить суммарный нуклеотидный материал меченых полипиримидиновых последовательностей. Таким путем, однако, нельзя определить ССМ лигированных фрагментов, поскольку их распределение в щелочном сахарозном градиенте почти совпадает с распределением молекул суммарной ЯДНК, в которые включается метка из L-[метил- ^{14}C]метионина в результате постоянно осуществляемого в клеточном цикле процесса пострепликативного метилирования [6]. Следовательно, во фракциях градиента, содержащих фрагменты ДНК $> 8\text{S}$, будут находиться как новообразованные, меченные по остаткам $m^3\text{C}$, Т, А и С, так и еще не вступившие в репликацию, меченные только по остаткам $m^3\text{C}$ последовательности ЯДНК. Поэтому ССМ лигированных интермедиатов мы определяли в нДНК, меченной [2- ^{14}C]оротовой кислотой. Для этой фракции рСР и полипиримидиновые последовательности гидролизовали до оснований и измеряли включенную в собственно остатки $m^3\text{C}$ радиоактивность. В такой постановке опыта мы смогли оценить ССМ исключительно новообразованных в присутствии меченого предшественника и ингибиторов метилирования ЛРИ, а не суммарной ЯДНК.

Как и ранее это было выявлено [3, 6], фрагменты Оказки существенно отличаются от лигированных ноДНК (табл. 1) не только по уровню, но и по характеру метилирования (распределению mC по принципиальным последовательностям). Во фрагментах Оказки простокос пшеницы преимущественно метилируются цитозиновые остатки в полипиримидиновых (Ру₂-Р₄-1, 2, 3) последовательностях, а у лигированных ноДНК на долю mC в этих последовательностях приходится только около 50% от всех возникших в ноДНК остатков mC (табл. 1). Можно видеть (табл. 1), что несмотря на заметное (~30%-ное) ингибирование метилирования новообразованной в присутствии SIBA яДНК ССМ фрагментов Оказки и ЛРП контрольных и опытных простокос практически не различаются. Следовательно, конкурентное ингибирование метилирования репликационных фрагментов в данном случае заметно не изменяет его специфичность.

Однако наблюдаемое в присутствии 5-azdC небольшое «остаточное» метилирование как фрагментов Оказанки, так и липидных зон реализуется в Рн-С-Рн последовательностях в относительно большей степени, чем в контрольных проростках. Вероятно, это может объясняться тем, что при хаотическом замещении остатков С на остатки 5-азациитозина этот аналог будет распределен между моно- и полипиримидиновыми фрагментами нодНК пропорционально распределению в них остатков С (в отношении ~1:3 [20]). Следовательно, по сравнению с моноимпиримидиновыми полипиримидиновые 5-azdC-содержащие блоки будут ингибировать действие ДНК-метилазы в гораздо большей степени. В результате мы наблюдаем относительное «усиление» метилирования цитозиновых остатков в Рн-С-Рн последовательностях.

Итак, с помощью ингибиторов метилирования SIBA и 5-aza-CS здесь и ранее показана возможность дифференцированного влияния на процессы репликативного и пострепликативного метилирования яДНК в клетках высших растений. Характер и степень влияния этих ингибиторов на синтез и отдельные этапы метилирования яДНК, как и собственно механизм их влияния различны. Это позволяет использовать SIBA и 5-aza-CS в качестве новых эффективных инструментов для более глубокого изучения метилирования ДНК, клеточной дифференцировки и развития растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vanyushin B. F. // Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1984. V. 108. P. 99—114.

2. Башкиев Е. А., Кирос М. Д. № 8. С. 1448-1456.
3. Кирос М. Д., Кутуев Л. Т. 49. № 8. С. 1357-1366.
4. Кирос М. Д., Гичаев Н. Т. 49. № 10. С. 1690-1702.
5. Кирос М. Д., Александрович Н. Т. 50. № 3. С. 625-637.
6. Кирос М. Д., Александрович Н. Т. 1988. Т. 53. № 3. С. 1397.
7. Kiryakov G. I., Kirnos M. D. № 2. P. 225-228.
8. Киряков Т. Н., Исаев Л. С. 153-161.
9. Woodcock D. M., Adams J. K. № 1. P. 15-22.
10. Woodcock D. M., Crowther P. acta. 1984. V. 783. № 2. P. 227.
11. Bigler B., Bertaux O., Valenc F. Friedman S.J./Molecular Pharrm.
12. Jones P. A., Taylor S. M./Nu
13. Cressot F., Acs G., Christman
14. Taylor S. M., Taylor S. J. J. M.
15. Bouchard J., Mompalier R. S.
16. Santi D. V., Norment A., Ga
7. P. 6903-6997.
18. Винокушников М. П., Пестерев
- мая. 1985. Т. 50. № 5. С. 749-
19. Кирос М. Д., Александрович
- Т. 53. № 3. С. 355-367.
20. Кирос М. Д., Александрович
- № 8. С. 1458-1474.
21. Кирос М. Д., Волкова С. А.
- С. 1587-1596.
22. Burton K., Petersen G. B./Bio
23. Jackson D. A., McCready S./To
24. Краковский А. А., Кушково
25. ВИНИТИ, 1986
26. Аманжол Б. Е., Александрович
- мая. 1986. Т. 51. № 10.
27. Vesely J., Cihak A./Pharmac. T
28. Jones P. A. DNA methylation
-
Heidelberg; Tokyo: Springer1989. P. 1319-1326.
29. Smith D., Melles U., Lofth
30. Taylor I. H. DNA synthesis; p
- P. 143-159.
31. Кирос М. Д., Антоховская Н
- Т. 51. № 11. С. 1875-1885.
32. Shaler D. A., Priest I. H./Ame
33. Gregory P., Greene C., Shapiro
1986. P. 136.
34. Schmidt H., Wolf S. F., Miga
35. Jablonka E., Goletto R. Spri
36. Антоховская Н. А., Александр
- Т. 51. № 11. С. 1808-1874.

Лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. И.
Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова

INHIBITION AND CHAIN FRAGMENT METHYL BY 5-AZACYTID

KIRNOS M. D., ALEKSANDR
A. N. Belozersky Laboratory of
M. V. Lomon

It was found that after 3-hour incubation of the cells (10⁷ cells/ml) with [2-¹⁴C]orotic acid in the presence of 5-azaC* (100 µg/ml) or S-isobutyl

идиловой и дезоксицитидиловой
о, для определения ССМ (фраг-
С) метионином, нужно разделить
гидролизные нуклеотиды рСР и
жидкотопный материал меченых
тей. Таким путем, однако, нель-
зю, поскольку их распреде-
де почти совпадает с распреде-
которые включаются метка из
постоянно осуществляемого в
кативного метилирования [6].
, содержащих фрагменты ДНК>
юванные, меченные по остаткам
з в репликацию, меченные только
ДНК. Поэтому ССМ лигирован-
ОДНК, меченной [^{14}C]оротовой
полипиримидиновые последова-
и измеряли включенную в соб-
. В такой постановке опыта мы
овообразованных в присутствии
эров метилирования ЛРИ, а не

[6], фрагменты Оказаки сущест-
водНК (табл. 1) не только по
пани (распределению m^3C по пи-
зо фрагментах Оказаки простор-
ируются цитозиновые остатки в
тедователюстях, а у ингибиро-
дательности приходится только
ДНК остатков m^3C (табл. 1).
з на заметное (~30%-ное) инги-
ишюной в присутствии SIBA яДНК
итрольных и опытных простоток
гелюно, конкурентное ингибиро-
агментов в данном случае замет-

5-azaC небольшое «остаточное»
ки, так и линкерных зон реализу-
в относительно большей степени,
тно, это может объясняться тем,
тгов С на остатки 5-азациитина
у моно- и полипиримидиновых
о распределению в них остатков
ательно, по сравнению с монопи-
-azaC-содержащие блоки будут
в гораздо большей степени. В ре-
«хусиленне» метилирования цито-
тельностих.
илирования SIBA и 5-azaC здесь
зренцированного влияния на про-
тисного метилирования яДНК и
и степень влияния этих ингиби-
гилирования яДНК, как и собст-
вины. Это позволяет использовать
активных инструментов для более
ИК, клеточной дифференцировки и

УРА

biology and Immunology, Berlin; Heidel-
114.

2. Башкире Е. А., Кирнос М. Д., Александровичкина Н. И. и др. //Биохимия. 1980. Т. 45. № 8. С. 1448—1456.
3. Кирнос М. Д., Кутуева Л. И., Ганичева Н. И., Ванюшин Б. Ф. //Биохимия. 1981. Т. 49. № 8. С. 1357—1365.
4. Кирнос М. Д., Ганичева Н. И., Кутуева Л. И., Ванюшин Б. Ф. //Биохимия. 1984. Т. 49. № 10. С. 1690—1702.
5. Кирнос М. Д., Александровичкина Н. И., Кутуева Л. И. и др. //Биохимия. 1987. Т. 52. № 4. С. 625—637.
6. Кирнос М. Д., Александровичкина Н. И., Кутуева Л. И., Ванюшин Б. Ф. //Биохимия. 1988. Т. 53. № 8. С. 1397—1405.
7. Kiryanov G. I., Kirnos M. D., Demidkina N. P. et al. //FEBS Letters. 1980. V. 112. № 2. P. 225—228.
8. Кирьянов Г. И., Исаева Л. В., Кирнос М. Д. и др. //Биохимия. 1982. Т. 47. № 1. С. 153—161.
9. Woodcock D. M., Adams J. K., Cooper I. A. //Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 696. № 1. P. 15—22.
10. Woodcock D. M., Crowther P. J., Simmonds D. L., Cooper I. A. //Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 783. № 2. P. 227—233.
11. Bigler B., Bortaux O., Valencia R. //J. Cell Physiol. 1980. V. 103. № 2. P. 149—157.
12. Friedman S. //Molecular Pharmacology. 1981. V. 19. № 2. P. 314—320.
13. Jones P. A., Taylor S. M. //Nucleic Acids Res. 1981. V. 9. № 12. P. 2933—2947.
14. Creusot F., Acs G., Christian J. K. //J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 4. P. 2041—2048.
15. Taylor S. M., Jones P. A. //J. Mol. Biol. 1982. V. 162. P. 679—692.
16. Bouchard L., Montparler R. L. //Molecular Pharmacology. 1983. V. 24. P. 109—114.
17. Santi D. V., Norment A., Garrett C. E. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6093—6097.
18. Воеводинский М. Т., Пестерев В. Ф., Канопкайт С. И., Бурляков Я. И. //Биохимия. 1985. Т. 50. № 5. С. 749—754.
19. Кирнос М. Д., Александровичкина Н. И., Кутуева Л. И., Ванюшин Б. Ф. //Биохимия. 1988. Т. 53. № 3. С. 355—367.
20. Кирнос М. Д., Александровичкина Н. И., Ванюшин Б. Ф. //Биохимия. 1981. Т. 46. № 8. С. 1458—1474.
21. Кирнос М. Д., Волкова С. А., Ганичева Н. И. и др. //Биохимия. 1983. Т. 48. № 10. С. 1587—1596.
22. Burton K., Petersen G. B. //Biochem. J. 1960. V. 75. P. 17—21.
23. Jackson P. A., McCready S. J., Cook P. R. //J. Cell Sci. 1984. V. 1. P. 51—79.
24. Краевский А. А., Куранова М. К. Репликация ДНК у эукариот. «Молекулярная Биология». М.: ВИНТИ, 1986. Т. 2. 132 с.
25. Ашапки В. В., Александровичкина Н. И., Кирнос М. Д., Ванюшин Б. Ф. //Биохимия. 1986. Т. 51. № 10. С. 1587—1594.
26. Vesely J., Cihak A. //Pharmac. Ther. 1978. V. 2. P. 813—840.
27. Jones P. A. DNA methylation. Biochemistry and biological significance. N. Y.; Berlin; Heidelberg; Tokyo: Springer-Verlag, 1985. P. 165—187.
28. Smith D. W., Garland A. M., Herman G. et al. //EMBO Journ. 1985. V. 4. № 5. P. 1319—1326.
29. Messer W., Belleche U., Lother U. //EMBO Journ. 1985. V. 4. № 5. P. 1327—1332.
30. Taylor J. H. DNA synthesis: present and future. N. Y.; L: Plenum Press, 1978; P. 143—159.
31. Кирнос М. Д., Артюховская Н. А., Александровичкина Н. И. и др. //Биохимия. 1985. Т. 51. № 11. С. 1875—1885.
32. Shafer D. A., Priest J. H. //Amer. J. Hum. Genet. 1984. V. 36. № 3. P. 534—545.
33. Gregory P., Greene C., Shapiro E., Wang N. //Cytogenet. Cell Genet. 1985. V. 39. № 3. P. 234—238.
34. Schmidt M., Wolf S. F., Migeon B. R. //Exp. Cell Res. 1985. V. 158. P. 301—310.
35. Jablonka E., Gollain R., Sperling K. et al. //Chromosoma. 1987. V. 95. P. 81—88.
36. Артюховская Н. А., Александровичкина Н. И., Ашапки В. В. и др. //Биохимия. 1986. Т. 51. № 11. С. 1888—1874.

Лаборатория молекулярной биологии и биогенетической химии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
12.VIII.1987

INHIBITION AND CHANGES IN THE SPECIFICITY OF OKAZAKI FRAGMENT METHYLATION IN WHEAT SHOOTS INDUCED BY 5-AZACYTIDINE OR S-ISOBUTYLADENOSINE

KIRNOS M. D., ALEKSANDRUSHKINA N. I., VANYUSHIN B. F.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Biogeochemistry,
M. V. Lomonosov Moscow State University

It was found that after 3-hour incubation of cut-off etiolated wheat shoots (72 hours-
old) with [^{14}C]thiouracil in the presence of DNA-methylation inhibitors, 5-azacytidine
(5-azaC*, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or S-isobutyladenosine (SIBA, 1.5 mM), the replicative synthesis

of labeled nuclear DNA in first leaf cells is inhibited by about 20%. In this case, the relative rates of the labeled pyrimidine precursor incorporation into newly synthesized nDNA (psDNA) and the formation of ligated replicative intermediates (LRI) do not change significantly. SIBA practically completely blocks the postreplicative methylation of nsDNA and causes a ~30% inhibition of methylation of Okazaki fragments (ML=100 m³C/³H(C+³m³C) decreases from 7.0-7.8 to 5.3) and LRI (ML decreases from 10.4 to 6.6). Under effects of 5-azaC, the replicative and postreplicative methylation of nDNA in first leaf cells is inhibited dramatically: the ML of newly synthesized Okazaki fragments and LRI is as low as 1.0±0.2. SIBA does not affect the specificity of methylation, i. e. ³m³C distribution among pyrimidine isopaths in nsDNA, whereas in the presence of 5-azaC the relative amount of ³m³C in nsDNA increases in alternating Pu-Py-Pu sequences from Okazaki fragments and LRI. Thus, under effects of SIBA and 5-azaC, the methylation of nDNA in wheat shoots appears to be markedly inhibited. In newly synthesized duplexes of nDNA, additional multiple undermethylated sites are formed; the specific organization of methylated sites in the replicating nuclear genome changes drastically under these conditions.

РЕЦЕПТОР КИНЕТИЧЕСКИ

Рассмотрены основные механизмы передачи клеточного ответа. Обсуждены детекторы, обеспечивающие сравнение эффективности взаимодействия. Рассмотрены современные представления о рецепторах. Обсуждается химический сигнал в системе рецепторов к клеточным лигандам — стимуляторам десенсилизации в рамках представлений о рецепторно-ферментной системе.

На молекулярном уровне осуществляется с помощью посредства рецепторно-ферментной системы выбор «сигнала» — рецепторами, нейромедиатора, клеточного сигнала с рецептором познания из потока возмущающих воздействий, выступающих в виде регуляторной системы, обходящейся в концентрированном (САМР, ионы кальция, ол).

Практически все клетки перерабатывают информацию крови, прежде всего на уровне лиганд-рецепторных комплексов молекул представленных клеток центральных органов. Принципиально важными клеточным ответом с белковыми специфическими, интерлейкины, факторы, создание фундаментальных управления клеточными химическими информацией и рецепторно-ферментных систем.

Рецепторы как селективные детекторы сигнала из хаотического сигнала из хаотического сигнала.

Взаимодействие белков-биохимических явлений: ферментного взаимодействия. Их характеристики этих